利用 CpG DNA 甲基化酶 *M.Sss* I 共表达载体制备限制性内切酶 *Not* I *

王佩 [1,2**] 陈凯 [1,2**] 高嵩 [1,2,3***]

（1 淮海工学院江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室 连云港 222005 2 淮海工学院江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 连云港 222005 3 江苏省海洋资源开发研究院 连云港 222005）

摘要 限制性核酸内切酶是 DNA 重组的重要分子生物学工具。由于其本身对 DNA 有切割作用导致其重组表达在技术上十分困难，产率低、提纯程序复杂。而商业化生产所采用的利用专一型甲基化酶保护宿主 DNA 的限制酶表达技术流程繁琐、实用性有限。本研究为表达 *Not* I 限制酶，采用来源于 *Spiroplasma* sp. MQ1 的 DNA 甲基化酶 *M.Sss* I 特异性甲基化 CpG 序列，甲基化后的 DNA 会免受识别位点中包含 CpG 序列的限制酶 *Not* I 的切割。将甲基化酶 *M.Sss* I 导入大肠杆菌表达宿主 ER2566 中后，*M.Sss* I 基因在宿主中持续表达并甲基化宿主 DNA 成 CpG 甲基化样式；利用此表达体系制备限制性内切酶 *Not* I 获得成功。并借助引入纯化标签经过简便的 Ni 亲和层析和阴离子交换层析 2 步层析洗脱纯化，制备了高活力高纯度的重组限制酶 *Not* I。此表达体系可应用于一系列识别位点中包含 CpG 序列的限制酶的表达。

关键词 重组蛋白表达 限制性内切酶 甲基化酶

Production of Restriction Endonuclease *Not* I Utilizing CpG DNA Methylase *M.Sss* I Co-expression Vector

WANG Pei[1,2] CHEN Kai[1,2] GAO Song[1,2,3]

(1 Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

(2 Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

(3 Jiangsu Marine Resources Development Research Institute, Lianyungang 222005, China)

Abstract Restriction endonucleases are important molecular biology tools for DNA recombination. Because of the cleavage of DNA, their recombinant expression is difficult with low yields and complicated purification processes. In commercial productions, the technology that uses specific methylases to protect host DNA from digestion of the expressed restriction enzymes was cumbersome and practically limited. In this study, the expression of restriction enzyme *Not* I was performed by using the DNA methylase *M.Sss* I

* 国家自然科学基金（31470275，31300652）、江苏省自然科学基金（BK20130406）、江苏省高校自然科学基金（13KJB180003）、江苏省高校优势学科建设工程

** 同为第一作者
*** 通讯作者，电子信箱：gaosong@hhit.edu.cn

derived from *Spiroplasma* sp. MQ1 which specifically kept CpG sequence methylated. The methylated DNA was protected from the cutting of *Not* I whose recognition sequence contained CpG. The gene of methylase *M.Sss* I was introduced into *Escherichia coli* ER2566 and constitutively expressed, resulting in the CpG methylation pattern of the host DNA. Restriction enzyme *Not* I was successfully expressed in this *E. coli* strain. Furthermore, by adding a purification tag to one terminus of the enzyme, recombinant *Not* I was prepared as a highly purified and active product through two simple Ni-affinity and anion exchange chromatography steps. This expression system can be applied for the preparation of a series of restriction enzymes with CpG in their recognition sequences.

Key words Recombinant protein expression Restriction endonuclease Methylase

依赖于核酸序列识别并特异性切割 DNA 的限制性内切酶是现代分子生物学和基因工程领域研究基因组成、功能和表达不可或缺的重要工具。随着这类酶的广泛应用，近年来其商业化生产和重组表达日益增长[1-3]。然而，由于限制酶具有切割 DNA 的特性，在对其进行重组表达时往往会使宿主 DNA 被切割，造成宿主菌的死亡[4-7]。迄今为止，限制性内切酶的重组表达在技术手段上仍然存在极大困难。根据最早从事限制性内切酶商业化生产的美国 New England Biolabs 公司（NEB）的公开专利可知，NEB 公司推出的多种限制性内切酶产品都是利用该限制性内切酶对应的专一型甲基化酶对宿主 DNA 进行保护，从而获得重组表达的限制性内切酶[8-9]。此方法的原理是，产生限制酶的天然菌株会同时产生相应的专一型甲基化酶，将限制酶的识别位点甲基化，保护自身的 DNA 免受限制酶的切割[1,10]。但是这种利用专一型甲基化酶的传统限制酶表达技术十分繁琐、应用范围较为狭窄。

DNA 甲基化酶 *M.Sss* I 是一种来源于 *Spiroplasma* sp. MQ1 的甲基化酶[11]。这种甲基化酶可以特异性的将 DNA 中的 CpG 序列甲基化，而由于序列 CpG 是许多限制性内切酶酶切位点的子集，对 CpG 的甲基化能使 DNA 免受识别位点中含有 CpG 序列的限制性内切酶的切割（www.neb.com）。若利用甲基化酶 *M.Sss* I 的这一特性对宿主细胞的 DNA 进行甲基化，使其形成 CpG 甲基化样式，该宿主细胞的 DNA 将会免受许多限制性内切酶的切割，并能支持这些酶的表达。

本研究将 DNA 甲基化酶 *M.Sss* I 导入大肠杆菌表达宿主 ER2566 中，使 *M.Sss* I 基因在宿主中持续表达，并甲基化宿主 DNA 形成 CpG 甲基化样式。利用这一表达宿主进行常用限制性内切酶 *Not* I 的重组表达获得成功。同时，表达产物末端添加了多聚组氨

酸标签，仅通过简便的 Ni 亲和层析和阴离子交换层析 2 步柱洗脱纯化步骤即获得了性能优、活力高且纯度好的重组限制酶 *Not* I。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌 DH5α和 ER2566 购自美国菌种保藏中心（ATCC）；质粒 pACYC184 购自武汉淼灵生物科技有限公司；质粒 pUC19、pET-28b 及其改造的衍生质粒由本实验室提供。

1.1.2 仪器和试剂 引物合成、基因合成及测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成；细胞高压破碎仪购自广州聚能生物科技有限公司；Ni 亲和层析基质和阴离子交换层析基质（Toyopearl）购自东曹（上海）生物科技有限公司；限制性内切酶、CutOne Buffer、T4 DNA Ligase、抗生素等生化试剂购自江苏愚公生命科技有限公司；B-PER 细菌蛋白提取试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；蛋白分子量标准购自金斯瑞生物科技有限公司；胶回收试剂盒购自广州飞扬生物工程有限公司（Omega Bio-Tek）；质粒提取试剂盒（Axygen）购自美国 Corning 公司；凝胶成像仪（Clinx）购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 甲基化酶 *M.Sss* I 组成型表达菌株的构建 甲基化酶 *M.Sss* I 的 DNA 序列（GenBank：X17195.1）通过基因合成获得，连接至克隆载体 pUC57 上，构建 pUC57-*M.Sss* I 质粒。合成序列全长 1360 bp，5’-端的增添序列包括：*Hind* III 酶切位点和 *E. coli* pltl promoter 序列（GenBank：M88256.1），3’-端的增添序列包括：TAA 终止密码子和 *E. coli* rrnB T1 terminator 序列（GenBank：CP010229.1），以及 *Hind* III 酶切位点。pUC57-*M.Sss* I 质粒经 *Hind* III 单酶切后，含有 *M.Sss* I 基因的片段以 T4 DNA Ligase 连接至相同限制性内切酶酶切后的 pACYC184 载体上，并转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞进行质粒扩增，然后提取重组质粒 pACYC184-*M.Sss* I。此质粒经测序正确后，转化进入感受态细胞 ER2566，并于含 35 mg/l 氯霉素的 LB 平板上生长，获得甲基化酶 *M.Sss* I 组成型表达菌株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]，利用大肠杆菌 pltl 启动子持续表达甲基化酶 *M.Sss* I。

1.2.2 限制性内切酶 *Not* I 重组表达菌株的构建 限制性内切酶 *Not* I 的 DNA 序列（GenBank：ABC87270.1）通过基因合成获得，连接至克隆载体 pUC57 上，构建 pUC57-*Not* I 质粒。合成序列全长 1164 bp，包括 5’-端添加的 *BamH* I 酶切位点和 3’-端添加的 TAA 终止密

码子以及 *Xho* I 酶切位点。pUC57-*Not* I 质粒经 *BamH* I 和 *Xho* I 双酶切后，带有 *Not* I 基因的片段以 T4 DNA Ligase 连接至相同限制性内切酶酶切后的 pET-28b 载体上，使 *Not* I 基因的表达框与载体上的多聚组氨酸纯化标签 6xHis 的表达框一致。连接产物转化进入甲基化酶 *M.Sss* I 组成型表达菌株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I] 感受态细胞，并于含 75 mg/l 卡那霉素和 35 mg/l 氯霉素的 LB 平板上生长，获得限制性内切酶 *Not* I 重组表达菌株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I, pET-*Not* I]。限制性内切酶 *Not* I 的基因序列经测序确认正确，诱导后表达为 N-端融合 6xHis 纯化标签的重组限制酶 *Not* I。

1.2.3 重组限制酶 *Not* I 的诱导及活性检测　将限制性内切酶 *Not* I 重组表达菌株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I, pET-*Not* I] 接种于含 75 mg/l 卡那霉素和 35 mg/l 氯霉素的液体 LB 培养基中，在 37°C 以 200-250 rpm 振荡培养至 OD_{600} 值为 0.6-0.8，然后加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG，在 16°C 以 200-250 rpm 振荡培养 16 h。以 8000g 离心 10 min 收集菌体后，使用 B-PER 细菌蛋白提取试剂对菌体总蛋白进行提取。取 1-3 µl 细菌蛋白粗提液，在 1X CutOne Buffer（51 mM 乙酸钾, 22 mM Tris-AC, 10 mM 乙酸镁, 1 mg/ml BSA, pH 8.0）缓冲条件下的 10 µl 反应体系中，与 *Not* I 的酶切底物（control plasmid，改造的 pET-28b 质粒，带有 2 个 *Not* I 酶切位点）在 37°C 温育 15 min，然后使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测底物被细菌蛋白粗提液消化的情况。

1.2.4 重组限制酶 *Not* I 的纯化　重组限制酶 *Not* I 经 IPTG 诱导后，培养液以 8000g 离心 10 min 收集菌体。菌体以缓冲液（10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5% 甘油, 0.15% Triton X-100, 5 mM 咪唑, 1 mmol/l 苯甲基磺酰氟）充分重悬后，以细胞高压破碎仪裂解。不可溶组分以 43,000g 低温离心 30 min 去除，含有重组限制酶 *Not* I 的上清可溶组分经过 Ni 亲和层析初步纯化（Toyopearl AF-Chelate-650M）和阴离子交换层析精细纯化（Toyopearl GigaCap Q-650M）。Ni 亲和层析过程中使用的缓冲液成分如下：平衡 Buffer - 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5% 甘油, 0.15% Triton X-100, 5 mM 咪唑；漂洗 Buffer - 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 250 mM NaCl, 5% 甘油, 0.15% Triton X-100, 20 mM 咪唑；洗脱 Buffer - 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 250 mM NaCl, 5% 甘油, 0.15% Triton X-100, 400 mM 咪唑。阴离子交换层析使用的缓冲液成分如下：平衡 Buffer - 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5% 甘油, 0.15% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT；梯度洗脱分别为 250 mM、300 mM、500 mM、700 mM、1 M NaCl。含有重组限制酶 *Not* I 的洗脱峰合并后，透析至贮存缓冲液（10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM NaCl, 50% 甘油, 0.15% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT）中，并添加 BSA 至终浓度 200 µg/ml，

长期保存于-20°C。整个纯化过程在 4°C 或冰上进行。

1.2.5 重组限制酶 *Not* I 的活力测定 将重组限制酶 *Not* I 进行梯度稀释后，在 1X CutOne Buffer 缓冲条件下的 20 µl 反应体系中，与 *Not* I 的酶切底物（control plasmid）在 37°C 温育 15 min，将能够把底物完全酶切的酶量定义为 1 U。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测底物的酶切情况，根据酶切完全时对应的稀释度计算重组限制酶 *Not* I 的活力。

1.2.6 星号活性及非特异性 DNA 酶污染检测 将重组限制酶 *Not* I 进行梯度稀释后，在 1X CutOne Buffer 缓冲条件下的 20 µl 反应体系中，与 *Not* I 的酶切底物（control plasmid）在 37°C 温育 60 min 或 16 h，然后使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测底物的酶切情况。

1.2.7 酶切再连检测 使用 20 U 重组限制酶 *Not* I 在 1X CutOne Buffer 缓冲条件下的 20 µl 反应体系中，与 0.2 µg 底物 DNA 分子（Common Fragment，894 bp，带有 1 个 *Not* I 酶切位点，位于 413 bp 处）在 37°C 温育 15 min。酶切完成后，在 80°C 温育 20 min 使限制酶 *Not* I 失活，然后在反应液中补充 ATP 至终浓度 0.5 mM，并使用 T4 DNA Ligase 在 22°C 连接 1 h。连接产物在 65°C 温育 10 min 失活后，加入 20 U 重组限制酶 *Not* I 进行再次酶切（37°C 温育 15 min）。酶切、连接及再次酶切的效率以 1%琼脂糖凝胶电泳检测，并以 Clinx GenoSens 凝胶成像分析系统进行量化分析。

1.2.8 蓝白斑检测 使用 10 U 重组限制酶 *Not* I 在 1X CutOne Buffer 缓冲条件下的 20 µl 反应体系中，与 1 µg pUC19 质粒 DNA 在 37°C 温育 15 min。酶切完成后，在 80°C 温育 20 min 使限制酶 *Not* I 失活，然后在反应液中补充 ATP 至终浓度 0.5 mM，并使用 T4 DNA Ligase 在 22°C 连接 1 h。连接产物转化进入 DH5α大肠杆菌感受态细胞中，并涂布含氨苄抗性的 IPTG/X-gal 平板，于 37°C 培养过夜。统计所得白斑（白色菌落）与蓝斑（蓝色菌落）的数目并计算白斑比例。将重组限制酶 *Not* I 酶切线性化后的 pUC19 质粒（未进行连接反应）作为对照，同样转化 DH5α大肠杆菌感受态细胞中，并在含氨苄抗性的 IPTG/X-gal 平板上培养过夜，用于蓝斑背景的统计。

2 结果

2.1 限制性内切酶 *Not* I 重组表达菌株的构建

首先构建了用于保护宿主 DNA 的甲基化酶组成型表达质粒 pACYC184-*M.Sss* I（图 1a）。该质粒含有甲基化酶 *M.Sss* I 的基因，并且 *M.Sss* I 基因被大肠杆菌组成型表达元件 pltl promote 和 rrnB T1 terminator 所调控。带有此质粒的大肠杆菌宿主细胞能够持续表达甲基化酶 *M.Sss* I，在宿主 DNA 上的 CpG 位点形成甲基化。而这种 CpG 甲基化样

式能够保护宿主 DNA 免受限制性内切酶 *Not* I 的切割（www.neb.com）。大肠杆菌 ER2566 细胞株经转化质粒 pACYC184-*M.Sss* I，形成了适合于表达限制性内切酶 *Not* I 的细胞株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]。此细胞株能够持续表达甲基化酶 *M.Sss* I，宿主 DNA 受到 CpG 甲基化样式的保护，不会由于限制性内切酶 *Not* I 的表达而死亡。

然后构建了限制性内切酶 *Not* I 的重组表达质粒 pET-*Not* I（图 1b）。限制酶 *Not* I 的基因被插入到 pET-28b 载体的表达区域，置于强诱导型启动子 T7 promoter 的调控之下，并与载体上的多聚组氨酸纯化标签 6xHis 融合，形成了带有 N-端融合 6xHis 纯化标签的重组 *Not* I 基因。将插入 *Not* I 基因的环状 DNA 分子 pET-*Not* I 转化进入 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]感受态细胞中，成功获得了限制性内切酶 *Not* I 重组表达菌株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I, pET-*Not* I]。由于 pACYC184 和 pET 质粒的复制子来源不同，可相容共存于同一个细胞株系中。值得一提的是，带有 *Not* I 基因的环状 DNA 分子 pET-*Not* I 只能转化进入宿主 DNA 受到 CpG 甲基化样式保护的 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]菌株，而转化其它宿主 DNA 未受 CpG 甲基化样式保护的菌株（如 DH5α等）则不能获得转化子。此现象表明，T7 promoter 调控下的 *Not* I 基因在非诱导条件下的微量本底表达即足以杀死 DNA 未受甲基化保护的宿主细胞。

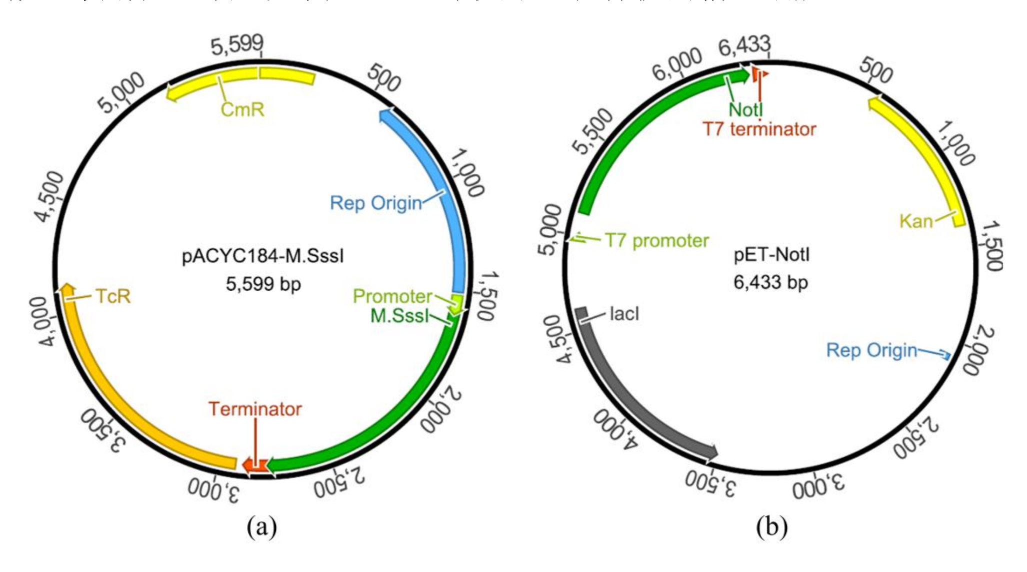


图 1　pACYC184-*M.Sss* I 和 pET-*Not* I 表达载体构建图谱

Fig. 1　Schematic of the pACYC184-*M.Sss* I and pET-*Not* I constructs.

（a）pACYC184-*M.Sss* I 质粒图谱。（b）pET-*Not* I 质粒图谱。环型质粒 DNA 分子以圆环表示，数字表示载体的分子大小；*M.Sss* I 和 *Not* I 基因均用绿色绸带表示，启动子、终止子、抗性基因、lacI 基因和复制子在图中都已标注。

(a) Schematic of pACYC184-*M.Sss* I. (b) Schematic of pET-*Not* I. The circular plasmid DNA molecules are represented by circles, with numbers indicating the lengths of the molecules (in bp). The *M.Sss* I and *Not* I genes are represented by green ribbons. Promoters, terminators, antibiotic resistance genes, the *lacI* gene, and the replication origins are indicated.

2.2　重组表达的限制酶 *Not* I 具有功能活性

为检测限制酶 *Not* I 的酶切活性，本研究改造了 pET-28b 质粒，插入一段带有一个 *Not* I 酶切位点的 DNA，新插入的 *Not* I 酶切位点与 pET-28b 质粒上原有的 *Not* I 酶切位点相距 860 bp。此质粒作为本研究中 *Not* I 的酶切底物（control plasmid），酶切后会形成大小分别为 5467 bp 和 860 bp 的 2 条 DNA 条带。在对 *Not* I 重组表达菌株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I, pET-*Not* I]以 IPTG 进行小量诱导后，通过差速离心收集菌体，破碎细胞并粗提总蛋白。对蛋白粗提液使用上述改造的 pET-28b 质粒进行 *Not* I 酶切活性检测，结果显示，改造的 pET-28b 质粒被切割成大小分别为 5467 bp 和 860 bp 的 2 条特异性条带，表明重组表达的限制酶 *Not* I 具有功能活性（图 2）。

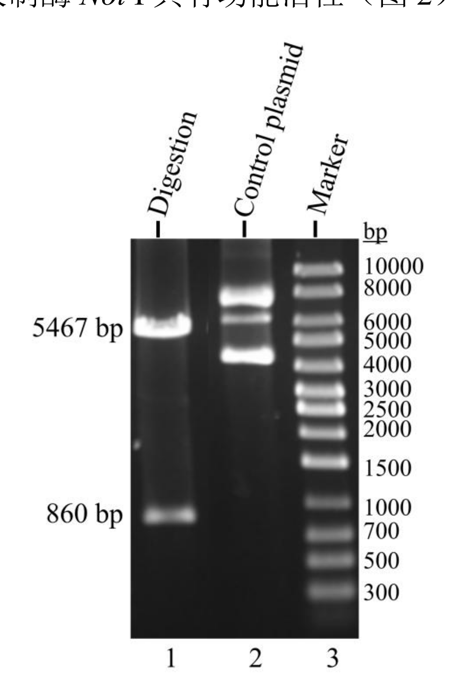


图 2　细胞总蛋白粗提液具有限制酶 *Not* I 酶切活性

Fig. 2　The total protein extract from the induced cells showed restriction activity of *Not* I.

泳道 1：1 μl 细胞粗提液特异性酶切对照质粒后的琼脂糖凝胶电泳；泳道 2：对照质粒；泳道 3：DNA 分子量标准。

Agarose gel shows the digested specific DNA fragments (lane 1, 5467 bp and 860 bp) of the control plasmid (lane 2) by 1 μl of the total protein extract from the induced cells.

2.3　重组限制酶 *Not* I 的制备及纯化

在验证了重组表达的限制酶 *Not* I 具有功能活性后，对 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I, pET-*Not* I]菌株进行了大规模诱导，大量表达重组限制酶 *Not* I。诱导后的菌体使用差速离心收集并破碎，然后对细胞裂解液进行纯化。纯化分为利用 N-端融合的 6xHis 纯化标签的 Ni 亲和层析和阴离子交换层析 2 个步骤。在 Ni 亲和层析步骤，重组限制酶 *Not* I 被 Ni 基质捕获，使用咪唑进行特异性洗脱后，获得纯度~50%的纯化效果。在 SDS-PAGE

胶图上，大小为 46 kDa 的重组限制酶 *Not* I 目的条带十分明显（图 3a）。然后使用阴离子交换层析进行精细纯化，将重组限制酶 *Not* I 蛋白的纯度提升至 75%以上（图 3b）。阴离子交换层析不仅进一步提高了蛋白纯度，而且去除了蛋白样品中的宿主 DNA 残留。

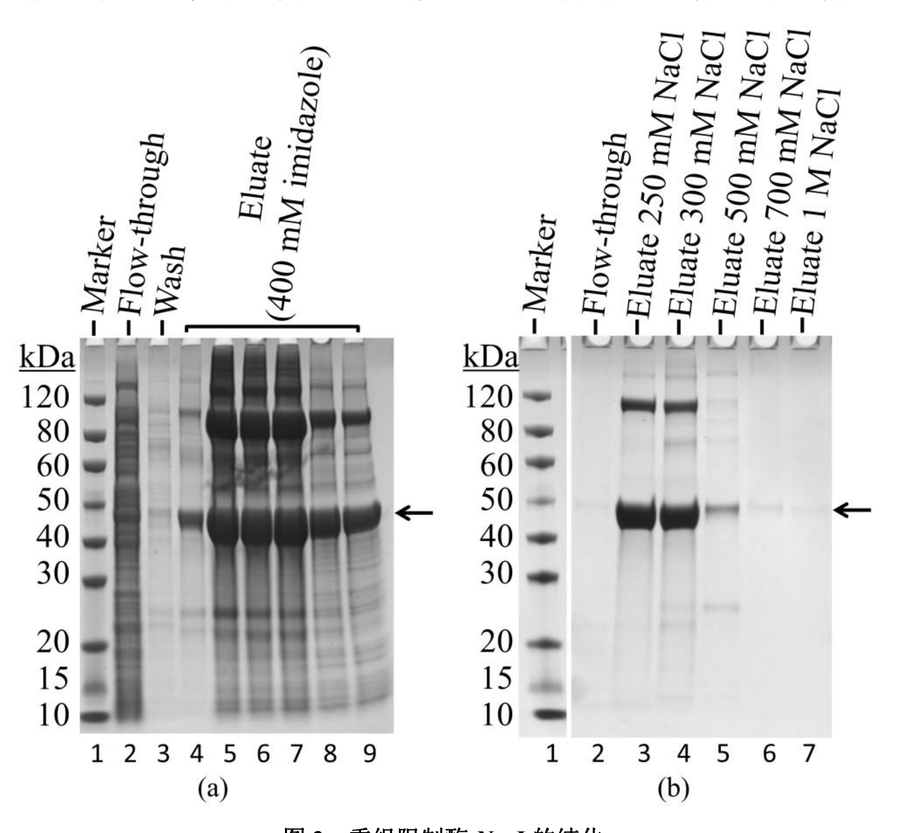


图 3　重组限制酶 *Not* I 的纯化

Fig. 3　Purification of the recombinant *Not* I.

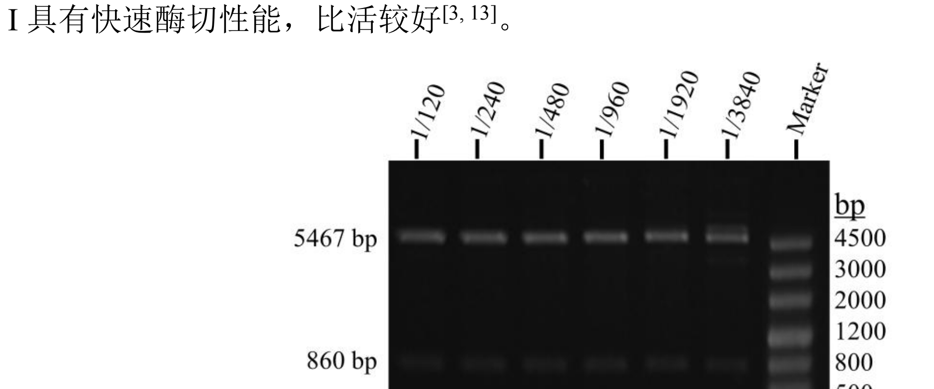
（a）重组限制酶 *Not* I 的 Ni 亲和层析纯化结果。（b）重组限制酶 *Not* I 的阴离子交换层析纯化结果。使用了 12%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）进行检测，每条泳道的样品内容标注在泳道上方。箭头指示了 Not I 的蛋白条带位置。

(a) SDS-PAGE analysis of the purification of recombinant *Not* I by Ni-affinity chromatography. Samples of flow-through after capture (lane 2), wash (lane 3), and imidazole elution (lanes 4-9) were electrophoresed. (b) SDS-PAGE analysis of the purification of recombinant *Not* I by ion-exchange chromatography. Samples of flow-through (lane 2, in 250 mM NaCl) and step gradient elution (lanes 3-7, 250 mM to 1 M NaCl) were electrophoresed. 12% SDS-PAGE gels were used and the protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue. The arrows indicate the band position of recombinant NotI.

2.4　重组限制酶 *Not* I 活力及酶切性能

纯化完成后，对重组限制酶 *Not* I 进行了酶活力检测，采用了快速酶切的检测标准[12]：37°C 下，在 20 µl 反应体系中，1 µl（1 U）酶能够在 15 min 内完全消化 1 µg 底物质粒 DNA。按照这一活性标准，将纯化后的重组限制酶 *Not* I 进行了梯度稀释并检测活力。结果表明，纯化后的重组限制酶 *Not* I 样本在稀释 1920 倍后仍能达到 1 U/µl 快速酶切活力（图 4a）。经换算，重组限制酶 *Not* I 比活力为 872,000 U/mg，产率为 1,152,000 U/L 诱导菌液（图 4b）。与以往的限制酶 *Not* I 制备方法相比，本研究制备的重组限制酶 *Not*

I 具有快速酶切性能，比活较好[3, 13]。



(a)

菌液量（L）	总活力（U）	蛋白量（mg）	比活力（U/mg）	产率（U/L）
1	1,152,000	1.32	872,000	1,152,000

(b)

图 4　重组限制酶 *Not* I 的活力及产率

Fig. 4　Determination of enzymatic activity and yield of the recombinant *Not* I.

（a）系列梯度稀释的 1 µl 重组限制酶 *Not* I 样品酶切 1 µg control plasmid 所得条带的琼脂糖凝胶电泳检测。每条泳道的稀释度已分别标注在泳道上方。（b）1 L 诱导后的细胞培养物经纯化后获得的重组限制酶 *Not* I 的产量。

(a) Agarose gel showing the digestion of 1 µg of control plasmid by 1 µl of the serial diluted recombinant *Not* I sample. Lanes 1-6 show dilution factors 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, 1/1920 and 1/3840, respectively. (b) Purification summary of recombinant *Not* I. Results from a typical purification of 1 L of induced culture are presented.

2.5　重组限制酶 *Not* I 纯度及质量

依据限制酶生产的行业标准，对限制酶的提纯以去除干扰限制酶功能的其它活性为目的，对其纯度的要求为无干扰活性，而提纯后的蛋白纯度并不是评估限制酶品质的必需标准[1]。星号活性及非特异性 DNA 酶污染检测、酶切再连检测、蓝白斑检测是对限制性内切酶纯度和质量进行检测的经典项目，一直为国际知名的限制性内切酶生产企业（如美国 NEB 公司等）所使用。本研究参照美国 NEB 公司的限制酶 *Not* I 质控方法，在这 3 个检测项目上对重组限制酶 *Not* I 的纯度和质量进行了检测（www.neb.com）。

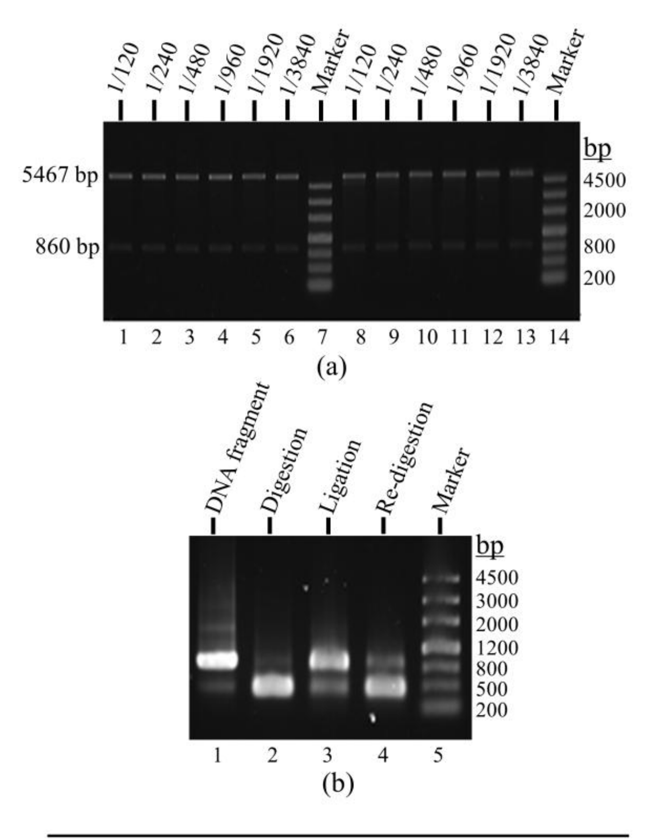
在星号活性及非特异性 DNA 酶污染检测中，将纯化的重组限制酶 *Not* I 进行梯度稀释，并与 1 µg 底物质粒 DNA 在 37°C 温育 60 min 或 16 h（图 5a）。结果显示，在温育 60 min 后，超过量（16 U，对应稀释度 1/120）的酶切并未造成底物 DNA 产生非特异性降解条带。在超长时间（16 h）温育后，4 U（对应稀释度 1/480）酶量的酶切未产生非特异性降解条带，而高达 8 U 酶量的酶切仅造成了轻微的非特异性降解。此结果表明重组限制酶 *Not* I 在超过量酶切和超长时间酶切条件下，均不会产生星号活性及非特异性

DNA 降解。

在酶切再连检测中，使用 20 U 重组限制酶 *Not* I 与底物 DNA 分子（Common Fragment）在 37°C 温育 15 min 后，所得的酶切片段使用 T4 DNA 连接酶进行连接，获得了>95%的重新连接。所得的连接产物>95%可以被重组限制酶 *Not* I 再次切开（图 5b）。此结果表明，重组限制酶 *Not* I 切割 DNA 形成的粘性末端准确并且完整。

在蓝白斑检测中，将含有单一 *lacZα*基因的 pUC19 载体以 10 U 酶量消化，重新连接后转化入大肠杆菌感受态细胞，涂布在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基平板上。连接正确的产物会生长出蓝色菌落，而连接错误（即 DNA 末端切口不完整）的产物将得到白色菌落，以此检测重组限制酶 *Not* I 切割 DNA 形成的粘性末端的完整性。结果显示，所得白斑（白色菌落）比例仅为 0.2%，表明重组限制酶 *Not* I 切割 DNA 形成的粘性末端十分完整（图 5c）。

以上 3 项重组限制酶 *Not* I 的检测结果与 NEB 公司公布的限制酶 *Not* I 质控标准（Certificate of Analysis）比较可知，本研究获得的重组限制酶 *Not* I 在这 3 个指标上达到了的 NEB 公司的商业化限制酶标准，具有高质量（www.neb.com）。



(a)

(b)

酶量	白斑数	总斑数	蓝斑背景	白斑比例
10 U	36	18771	2250	0.2%

(c)

图 5　重组限制酶 *Not* I 的质量控制检测显示高纯度及高质量

Fig. 5　Quality control of the recombinant *Not* I suggested high purity and quality.

（a）长时间孵育及星号活性检测。系列梯度稀释的 1 μl 重组限制酶 Not I 样品分别在 37°C 孵育 1 h（泳道 1-6）、16 h（泳道 8-13）时酶切 1 μg control plasmid 的琼脂糖凝胶电泳图。每条泳道的稀释度已分别标注在泳道上方。（b）酶切-再连接检测。（c）蓝白斑检测结果。

(a) Prolonged incubation and star activity assay. Agarose gel shows the digestion of 1 μg of control plasmid by 1 μl of the serial diluted recombinant *Not* I sample that incubated at 37°C for 60 min (lanes 1-6) or 16 h (lanes 8-13). The dilution factors are indicated at the top of each lane. (b) Ligation and recut assay. The DNA fragment and samples after digestion, ligation and re-digestion were analyzed by agarose gel electrophoresis. (c) Result of the blue/white screening assay.

3　讨论

限制性核酸内切酶作为分子生物学最重要的基础工具酶，其发现、应用开发和商业化生产奠定了重组 DNA 技术的基础，并在很大程度上推动了基因工程和现代分子生物学的发展[1-2]。然而，许多常用限制性内切酶目前仍面临重组表达产率低、制备工艺繁琐等难题，尤其是由于限制酶能降解宿主 DNA，目前的制备工艺对于每个限制酶都必须筛选出专一型的甲基化酶基因并克隆至宿主细胞中，用于保护宿主 DNA，增加了制备限制酶的繁琐程度。本研究利用甲基化酶 *M.Sss* I 的甲基化位点 CpG 是多种限制酶识别位点的子集这一特点，尝试构建一种宿主 DNA 具有 CpG 甲基化样式的表达菌株，可用于多种限制酶的重组表达。

在构建这一表达菌株时，使用了 *E. coli* pltl promoter 和 rrnB T1 terminator 作为甲基化酶 *M.Sss* I 的表达调控元件。这一对表达元件调控下的基因在大肠杆菌细胞中能持续稳定的表达，已在多种大肠杆菌工程菌株的改造中被用于实现外源蛋白的组成型表达[14-16]。对于表达宿主菌株的选择，由于大部分大肠杆菌工程菌株都具备甲基化限制基因（methylation requiring restriction，mrr），能够抵制具有甲基化活性的外源基因的转入，因此选择了大肠杆菌突变株 ER2566（mcrC-mrr）[17]。菌株 ER2566 中的甲基化限制基因 mrr 是缺失的，外源甲基化酶 *M.Sss* I 的基因能够顺利转入。在转入了含甲基化酶 *M.Sss* I 基因的质粒 pACYC184-*M.Sss* I 后，菌株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]被用于转化限制酶 *Not* I 的表达质粒 pET-*Not* I，并成功获得了转化子。而其它菌株（如 DH5α等）由于 DNA 未受 CpG 甲基化样式的保护，转化限制酶 *Not* I 的表达质粒 pET-*Not* I 未能产生转化子，这与以前的研究中观察到的现象一致[3, 13]。以上结果表明，本研究构建的菌株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]实现了甲基化酶 *M.Sss* I 的组成型表达，其宿主 DNA 受到了 CpG 甲基化样式的保护，在转化限制酶 *Not* I 的表达质粒 pET-*Not* I 后不会受到 *Not* I 降解宿主 DNA 的毒性影响，能够正常生长。而在 DNA 未受甲基化保护的菌株中，T7

promoter 调控下的 *Not* I 基因在非诱导条件下的微量本底表达即可将宿主细胞杀死。

快速酶切已成为现代生物医学研究者对于限制性内切酶酶切属性的一项基本要求，国际知名的限制酶生产商美国 NEB 公司（HF 及 Time-Saver 系列）、美国 Thermo Fisher Scientific 公司（FastDigest 系列）和日本 Takara Bio 公司（QuickCut 系列）都开发出了能够在 5-15 min 内快速酶切的限制酶产品。本研究利用宿主 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]重组表达的限制酶 *Not* I 也具有快速酶切的性能，1 U 重组限制酶 *Not* I 能在 15 min 内完全消化 1 μg 底物质粒 DNA。以这样的活性标准，重组限制酶 *Not* I 的比活力仍达到了十分优良的 872,000 U/mg，产率也达到了 1,152,000 U/L 诱导菌液。在以前的报道中，研究人员使用 *Eag* I 的甲基化酶对宿主 DNA 进行保护，开发出优化的限制酶 *Not* I 制备工艺，大大提升了 *Not* I 的表达效率[3]。这一经过优化的工艺制备的限制酶 *Not* I 仍属于慢速酶（在 1 h 内完成 1 μg 底物的消化），其比活力与本研究制备的能快速酶切的重组限制酶 *Not* I 处于同一水平，说明本研究构建的限制酶表达宿主 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]具有更高的表达效率，能产生具有更高活力的限制酶。

本研究对于重组限制酶 *Not* I 的纯化步骤包括 Ni 亲和层析和阴离子交换层析这 2 个上柱洗脱过程，与包含磷酸纤维素阴离子交换柱、肝素琼脂糖亲和层析柱、DEAE-琼脂糖柱、PEI 柱四步上柱洗脱过程的传统限制酶 *Not* I 纯化流程相比，大大简化了步骤；也比近年报道的优化的 *Not* I 制备工艺更为简便[3]。简化的制备工艺不仅缩短了纯化时间，也有利于保持酶活力及避免蛋白损失。本研究制备的重组限制酶 *Not* I 的蛋白纯度达到了 75%；更重要的是，3 项经典限制酶质检项目的检测结果证明，这 3 项指标均达到美国 NEB 公司限制酶 *Not* I 的质量标准，污染物水平极低，无干扰活性，具有高纯度及高质量。

甲基化酶 *M.Sss* I 的发现和研究历史已较为悠久，其甲基化作用产生的 CpG 甲基化样式能使 DNA 免于多种限制性内切酶的切割。美国 NEB 公司 Time-Saver 系列 185 种（2016 年 12 月份数据）商业化限制酶中，包括但不限于 *Aat* II、*Asc* I、*Cla* I、*Eag* I、*Fsp* I、*Mlu* I、*Not* I、*Pvu* I、*Sal* I、*Sma* I、*Xho* I、*Xma* I 等在内的 59 种常用限制酶已被证明会被 CpG 甲基化样式阻断切割作用（www.neb.com）。因此，本研究构建的表达宿主 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]可被应用于一大批限制酶的高效表达。重组限制酶 *Not* I 仅经过 2 步上柱洗脱的简便纯化流程即达到高品质的标准，说明由于菌株 ER2566 [pACYC184-*M.Sss* I]对限制酶 *Not* I 的高效表达，下游的提纯工艺可以简化。本研究不仅开发出一种更为简便的限制酶 *Not* I 制备工艺，成功制备了达到商业化品质标准、具有

快速酶切性能的重组限制酶 *Not* I，而且构建了基于甲基化酶 *M.Sss* I 的甲基化保护菌株，可应用于一大批酶切位点中包含 CpG 序列的限制酶的高效表达，为进一步提升这些限制酶的制备工艺提供了参考。

参考文献

[1] Pingoud A, Wilson G G, Wende W. Type II restriction endonucleases - a historical perspective and more. Nucleic Acids Research, 2014, 42(12): 7489-7527

[2] Tirabassi R. Foundations of Molecular Cloning - Past, Present and Future. https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles, 2017

[3] 张巧，叶贤龙，任桂萍，等. 限制性内切酶 NotI 提纯的新工艺. 中国生物工程杂志，2011, 31(8): 102-109

Zhang Q, Ye X L, Ren G P, et al. A new method for the purification of restriction enzyme NotI. China Biotechnology, 2011, 31(8): 102-109

[4] Naito T, Kusano K, Kobayashi I. Selfish behavior of restriction-modification systems. Science, 1995, 267:897-899

[5] Smith H O, Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. Journal of Molecular Biology, 1973, 81:419-423

[6] Haberman A, Heywood J, Meselson M. DNA modification methylase activity of Escherichia coli restriction endonucleases K and P. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1972, 69(11): 3138-3141

[7] Lunnen K D, Barsomian J M, Camp R R, et al. Cloning type-II restriction and modification genes. Gene, 1988, 74(1):25-32

[8] Zhu Z Y, Quimby A, Guan S X, et al. High Fidelity Restriction Endonucleases. US Patent, US20110151450A1, 2011-6-23

[9] Zhu Z Y, Blanchard A, Xu S X, et al. High Fidelity Restriction Endonucleases. US Patent, US20090029376A1, 2009-1-29

[10] Morgan R D, Camp R R, Wilson G G, et al. Molecular cloning and expression of NlaIII restriction-modification system in E. coli. Gene, 1996, 183(1-2): 215-218

[11] Renbaum P, Abrahamove D, Fainsod A, et al. Cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of the gene coding for the CpG DNA methylase from Spiroplasma sp. strain MQ1 (M SssI). Nucleic Acids Research, 1990, 18(5): 1145-1152

[12] Thermo Fisher Scientific Inc. Thermo Scientific Molecular Biology Solutions. Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA, 2012-2013

[13] Richard D M, Middleton, Jack S B, et al. Isolation DNA encoding the NotI restriction endonuclease and relation methods for producing the same. US Patent, 5371006, 1994-12-6

[14] Konstantinovic M, Maksimovic V, Nikcevic G, et al. Hybrid PLtl promoter with dual regulation control. DNA and Cell Biology, 1991, 10(5): 389-95

[15] Cheong D E, Choi J H, Song J J, et al. Construction of non-invasively constitutive expression vectors using a metagenome-derived promoter for soluble expression of proteins. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(6): 667-676

[16] Sabido A, Martínez L M, de Anda R, et al. A novel plasmid vector designed for chromosomal gene integration and expression: use for developing a genetically stable Escherichia coli melanin production strain. Plasmid, 2013, 69(1): 16-23

[17] Waite-Rees P A, Keating C J, Moran L S, et al. Characterization and expression of the Escherichia coli Mrr restriction system. Journal of Bacteriology, 1991, 173 (16): 5207-5219